اثر حشره‌کشی اسانس‌های *Eucalyptus microtheca* Muell. و *E. spathulata* Hook. به‌همراه قارچ بیمارگر *Lecanicillium muscarium* روی شته‌ی جالیز

جبرائیل رزمجو[1]*، مهدی داوری[2] و عسگر عباداللهی[3]

۱- ***نویسنده مسوول:** دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران (Razmjou@uma.ac.ir)

۲- استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

۳- استادیار دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی مغان، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۰/۱۹ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۵/۲۱

چکیده

به دلیل اثرات منفی سموم حشره‌کش متداول، جستجوی ترکیبات حشره‌کش سازگار با محیط ضروری می‌باشد. در تحقیق حاضر، اثر حشره‌کشی اسانس‌های دو گونه‌ی اکالیپتوس شامل *Eucalyptus microtheca* Muell. و *E. spathulata* Hook. و قارچ حشره‌کش *Lecanicillium muscarium* (Zare & Gams) روی شته‌ی جالیز (Aphis gossyeii Glover) ارزیابی شد. اسانس‌ها با استفاده از دستگاه کلونجر استخراج و تجزیه‌ی شیمیایی آن‌ها به‌وسیله‌ی دستگاه گاز کروماتوگرافی-طیف‌سنج جرمی انجام شد. بر اساس نتایج، ترکیب‌های ۸،۱-سینئول (۳۳/۷۷ درصد) و آلفا-پینن (۱۱/۱٤ درصد) در اسانس *E. microtheca* و ۸،۱-سینئول (٤۲/٦۳ درصد) و اکتان (۱۹/۹۰ درصد) در اسانس *E. spathulata* به‌عنوان اجزای اصلی شناسایی شدند. طبق نتایج، شته‌ی جالیز حساسیت بالایی به اسانس‌های مورد مطالعه نشان داد و مقادیر غلظت کشنده‌ی ۵۰ درصد برای اسانس‌های *E. spathulata* و *E. microtheca* به‌ترتیب ۱۲/۳٦٦ و ۱۵/۹۵۲ میکرولیتر بر لیتر برای حشرات بالغ شته‌ی جالیز محاسبه شد. غلظت کشنده‌ی ۵۰ درصد یک روزه قارچ $۵/۲۰۳\times۱۰^{۹}$ اسپور در میلی‌لیتر برآورد شد. با افزایش زمان، مقدار غلظت کشنده‌ی ۵۰ درصد قارچ بیمارگر کاهش یافته و بعد از ۵ روز به $۸/۵۸۳\times۱۰^{۲}$ اسپور در میلی‌لیتر رسید. در کاربرد توام غلظت‌های زیرکشنده‌ی اسانس‌ها و قارچ بیمارگر اثر تجمعی دیده شد. بر اساس نتایج تحقیق حاضر، اسانس‌های *E. microtheca* و *E. spathulata* و قارچ حشره‌کش *L. muscarium* پتانسیل استفاده در مدیریت شته‌ی جالیز را دارا می‌باشند.

کلید واژه‌ها: اسانس‌های گیاهی، *Lecanicillium muscarium*، اکالیپتوس، اثر سینرژیستی، GC-MS

مقدمه

شته‌ی جالیز (*Aphis gossypii* Glover) آفت اصلی محصولات مهمی از قبیل پنبه، سیب‌زمینی، کدو، مرکبات و بسیاری از گیاهان زینتی در سراسر جهان است. به‌طوری‌که علاوه بر تغذیه، از طریق انتقال بیش از ۵۰ نوع ویروس بیماری‌زای گیاهی هم قادر به ایجاد خسارت می‌باشد (Blackman and Eastop, 2000). این آفت در ایران از مهم‌ترین آفات پنبه، انواع کدوئیان و گیاهان گلخانه‌ای می‌باشد (Zamani et al., 2006). در حال حاضر استفاده از ترکیبات شیمیایی به‌عنوان متداول‌ترین روش در کنترل این آفت شناخته می‌شود. تأثیر زیان‌آور سموم شیمیایی روی سلامتی، پی‌آمدهای محیطی مختلف، مقاومت آفات و تمایل به استفاده از مواد غذایی ارگانیک، اجرای تحقیقات زیادی را در خصوص کاربرد آفت‌کش‌های زیستی سالم و در عین حال مؤثر باعث شده است (Devi and Maji, 2011؛

(Khalfi et al., 2008؛Edwards et al., 2008).

اسانس‌ها ترکیب‌های طبیعی با منشا گیاهی می‌باشند که سمیت بسیار کمی روی پستانداران داشته و به‌صورت محلی ترکیباتی در دسترس هستند (Isman et al. 2011؛ Regnault-Roger et al. 2012). در سال‌های اخیر تحقیقات مختلفی در مورد امکان استفاده از اسانس‌های گیاهی در کنترل آفات انجام شده است. خواص باکتری‌کشی (Lang and Buchbauer, 2012)، ویروس‌کشی (Elaissi et al., 2012)، قارچ‌کشی (Alizadeh et al., 2013)، نماتدکشی (Gupta et al., 2011)، حلزون‌کشی (Salama et al., 2012)، کنه‌کشی (Amizadeh et al., 2013) و حشره‌کشی (Ebadollahi and Jalali Sendi, 2015) اسانس‌های گیاهی در تحقیقات اخیر ثبت شده است.

جنس اکالیپتوس (*Eucalyptus*) از مهم‌ترین جنس‌های خانواده‌ی مورد (Myrtaceae) است که حدود ۷۰۰ گونه از درخت‌ها و درختچه‌ها را شامل می‌شود (Batish et al., 2008). اکالیپتوس‌ها درختانی بلند و همیشه سبز با شاخ و برگی غنی از غده‌های روغنی هستند. اسانس اکالیپتوس اثرهای بیولوژیکی مهمی از قبیل اثرهای ضد باکتریایی، ضد قارچی و آنتی‌اکسیدانی دارد (Batish et al., 2008؛ Elaissi et al., 2012). پژوهش‌های مختلفی در راستای استفاده از اسانس‌های گونه‌های مختلف اکالیپتوس در کنترل حشرات (Lucia et al., 2008)، کنه‌ها (Ebadollahi, 2013)، قارچ‌ها و نماتدهای بیماریزا (Gupta et al., 2011) انجام گرفته است.

قارچ‌های بیمارگر حشرات به‌عنوان یکی از عوامل عمده‌ی کنترل حشرات آفت در نظر گرفته می‌شوند (Weiguo et al., 2005). این قارچ‌ها در حقیقت اولین میکروارگانیزم‌های شناخته شده به‌عنوان عوامل بیماری‌زای حشرات می‌باشند (Abbasi, 1995). *Lecanicillium muscarium* (Zare & Gams) از جمله عوامل قارچی شناخته شده در کنترل آفات است که در ابتدا به‌عنوان بیمارگر جوربالان شناخته شد اما این قارچ از راسته‌های دیگر حشرات، برخی کنه‌ها و عنکبوتیان هم جدا شده است. البته این قارچ، هیپرپارازیت زنگ‌ها و سفیدک‌های سطحی هم می‌باشد (Askary et al., 1998).

با توجه به این‌که ترکیب‌های موجود در اسانس‌های گیاهی در شرایط محیطی و آب و هوایی مختلف تغییر می‌کند (Sefidkon et al., 2005, 2007). در تحقیق حاضر اجزای شیمیایی اسانس‌های مستخرج از گیاهان اکالیپتوس گونه‌ی *Eucalyptus microtheca* Muell. و اکالیپتوس گونه‌ی *E. spathulata* Hook. با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنجی جرمی شناسایی شدند. هم‌چنین اثر کشندگی اسانس‌های مذکور و قارچ بیمارگر *L. muscarium* روی شته‌ی جالیز بررسی شد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌های گیاهی و استخراج اسانس‌ها

برگ‌های دو گونه اکالیپتوس (*E. microtheca* و *E. spathulata*) از باغ گیاه‌شناسی کاشان جمع‌آوری شده، با آب مقطر شست و شو و در دمای اتاق (۱±۲۷ درجه سیلسیوس) دور از تابش نور خورشید خشکانده شدند. برای اسانس‌گیری از روش تقطیر با بخار آب و دستگاه اسانس‌گیری شیشه‌ای مدل کلونجر[1] استفاده شد. مقدار ۵۰ گرم از مواد خشک هر نمونه‌ی گیاهی در بالن شیشه‌ای ریخته شده و ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه گردید. اسانس‌گیری در دمای ۱۰۰ درجه‌ی سلسیوس انجام شد. زمان اسانس‌گیری ۳ ساعت در نظر گرفته شد (Sampson et al., 2005). اسانس‌های جمع‌آوری شده با استفاده از سولفات سدیم آب‌گیری شده و در ظروف با پوشش آلومینیومی تا زمان استفاده در یخچال در دمای ۴ درجه‌ی سلسیوس نگه‌داری شدند.

تجزیه‌ی شیمیایی اسانس‌ها

آنالیز با تزریق ۱ میکرولیتر از اسانس‌های مورد نظر

1- Clevenger

در دستگاه گاز کروماتوگرافی مدل HP 7890A[1] مجهز به سیستم آشکارساز طیف‌سنج جرمی مدل 5975C انجام شد. جداسازی کروماتوگرافیکی در ستون کاپیلاری اچ پی-۵[2] (۳۰ متر×۰/۲۵ میلی‌متر و ۰/۲۵ میکرومتر ضخامت) صورت گرفت. واسطه دستگاه GC-MS و منبع یونی در دماهای ۲۸۰ و ۲۳۰ درجه سلسیوس تنظیم شد. دمای تزریق ۲۵۰ درجه سلسیوس و برنامه دمایی ستون در ۵۰ درجه به‌مدت ۳ دقیقه بود که در دقیقه ۱۰ به ۱۱۰ درجه و در ۱۰ دقیقه بعدی تا ۱۸۰ درجه رسید. هلیم[3] (۹۹/۹۹۹ درصد) به‌عنوان گاز حامل به میزان ۱ میلی‌لیتر در هر دقیقه استفاده شد. تشخیص طیف‌ها با مطالعه اجزای آن‌ها و مقایسه طیف‌های استاندارد موجود در کتابخانه دستگاه (Wiley 7n(0).1 و NIST[4]) صورت گرفت (Adams, 2001).

پرورش شته‌ی جالیز

برای پرورش شته‌ی جالیز از رقم محلی خیار به‌عنوان گیاه میزبان استفاده شد. به‌منظور جلوگیری از آلودگی گیاهان به بیماری‌های قارچی، بذرها در محلول بنومیل ضدعفونی شده و در داخل گلدان‌های پلاستیکی با قطر دهانه ۲۰ و ارتفاع ۱۵ سانتی‌متر و در مخلوطی از خاک زراعی، ماسه و کود دامی به‌ترتیب به‌نسبت ۱:۱:۲ کشت شدند. کلنی شته پس از جمع‌آوری در گلخانه‌ی دانشکده‌ی کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه محقق اردبیلی برای حداقل یک ماه قبل از شروع آزمایش‌ها روی خیار پرورش داده شدند. پس از شروع آزمایش‌ها، کلنی به اتاق رشد با دمای ۲±۲۵ درجه‌ی سلسیوس و رطوبت نسبی ۵±۶۵ درصد و دوره‌ی نوری ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی منتقل شدند. برای انجام هر آزمایش، قطعات ۵×۴ سانتی‌متری از برگ‌های خیار تازه از قسمت بالایی گیاه بریده شده و روی پنبه اشباع شده با آب برای جلوگیری از خشک شدن برگ‌ها و شته‌ها در ظرف‌های پتری قرار داده شدند. قطعات پژمرده برگ‌های خیار به‌طور روزانه با قطعات تازه جایگزین شدند.

بررسی سمیت تنفسی اسانس‌ها روی شته

بر اساس آزمایش‌های مقدماتی، غلظت‌هایی که باعث ۲۵ تا ۷۵ درصد تلفات در حشرات می‌شوند بر اساس روابط لگاریتمی، تعیین شدند (Robertson et al., 2007). غلظت‌های محاسبه شده برای اسانس اکالیپتوس گونه‌ی *E. microtheca* دامنه‌ای از ۲/۵ تا ۴۷/۵ میکرولیتر بر لیتر و برای اسانس اکالیپتوس گونه‌ی *E. spathulata* از ۱/۲۵ تا ۴۳/۷۵ میکرولیتر بر لیتر را شامل می‌شدند. برای انجام آزمایش‌ها، قطعات دایره‌ای شکل از کاغذ صافی به قطر سه سانتی‌متر تهیه شده و داخل درپوش ظروف آزمایش قرار داده شده و ۲۰ شته‌ی ماده‌ی بالغ از کلنی پرورش یافته شته‌ها برداشته شده و به ظرف‌پتری اضافه شدند. غلظت‌های مذکور روی کاغذ صافی داخل سرپوش ریخته شده و بلافاصله سرپوش روی ظروف قرار داده شدند. جهت جلوگیری از خروج بخارات اسانس‌ها، اطراف سرپوش با نوار پارافیلم بسته شدند. در ظرف شاهد به‌جای اسانس از آب مقطر استفاده شد. هر آزمایش ۴ بار تکرار شد و شمارش تلفات ۲۴ ساعت بعد صورت گرفت.

کشت قارچ و تیمار آن روی شته

در این تحقیق از قارچ *L. muscarium* جدایه‌ی IRAN1768C تهیه شده از موسسه‌ی تحقیقات گیاهپزشکی کشور استفاده شد. برای تکثیر قارچ از محیط کشت جامد پی‌دی‌آ[5] استفاده شد. جهت اطمینان از خالص بودن قارچ از روش تک اسپور کردن[6] استفاده شد. برای آزمون زیست‌سنجی و بررسی اثر قارچ روی شته از روش دریافت اسپور قارچ با آلوده کردن برگ‌ها استفاده شد. در این آزمایش، تأثیر سوسپانسیون کنیدیوم قارچ با غلظت‌های 10^4، 10^5، 10^6، 10^7 و 10^8 اسپور در میلی‌لیتر به‌همراه شاهد (آب مقطر استریل حاوی توین-۸۰، ۰/۰۲ درصد) روی شته مورد بررسی قرار گرفت و

1- Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA
2- Capillary HP-5
3- Helium
4- National Institute of Standards and Technology
5- Potato Dextrose Agar (PDA)
6- Single spore

برگ‌های جوان خیار به غلظت‌های فوق آغشته شدند. سپس ۲۰ شته‌ی کامل به داخل ظروف پلاستیکی حاوی ۲۰ میلی‌لیتر آب آگار یک درصد و قطعات برگ خیار تیمار شده انتقال داده شدند. استفاده از آب آگار برای تامین رطوبت نسبی ۱۰۰ درصد در داخل ظروف پتری می‌باشد، زیرا رشد این قارچ در رطوبت نسبی ۱۰۰ درصد بهتر انجام می‌شود (Askary et al., 1998). سپس ظروف پتری به اتاقک رشد با دمای ۲±۲۲ درجه‌ی سلسیوس، رطوبت نسبی ۵±۷۵ درصد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی انتقال داده شدند. هر تیمار ۴ بار تکرار شد. آماربرداری از مرگ و میر حشرات کامل به‌مدت پنج روز به فاصله هر ۲۴ ساعت یک‌بار انجام شد. در این مدت، در صورت نیاز برای تغذیه‌ی شته‌ها برگ‌های تازه به داخل واحدهای آزمایشی اضافه و پوره‌های تازه متولد شده از واحدها حذف می‌شدند. تعداد حشرات تلف شده در هر تیمار پس از اثبات آلودگی به‌وسیله قارچ مورد نظر، ثبت شد.

بررسی اثر هم‌زمان تیمار قارچ و اسانس‌ها روی شته

برای تعیین اثر هم‌زمان قارچ و هریک از اسانس‌ها، از برگ خیار و قطعات دایره‌ای شکل کاغذهای صافی (با قطر ۳ سانتی‌متر) و ظروف پتری نه سانتی‌متری استفاده شد. همانند روش‌های ذکر شده در آزمایش‌های قبلی، غلظت‌های مورد نظر قارچ بیمارگر روی برگ‌های خیار و اسانس‌ها روی کاغذهای صافی ریخته شدند. کاغذهای صافی داخل درپوش ظروف پتری چسبانده شده و شته‌های کامل روی برگ‌های خیار در کف ظروف پتری قرار داده شدند. در گروه‌های شاهد روی برگ خیار از آب مقطر استریل حاوی توین-۸۰[1]، ۰/۰۲ درصد استفاده شد و تلفات ۲۴ ساعت بعد ثبت شدند.

بررسی اثر تیمار اسانس‌ها روی قارچ

برای این منظور از روش اختلاط اسانس با محیط کشت طبق روش Samie et al. (2011) استفاده شد. به این صورت که پس از تهیه محیط کشت پی‌دی‌آ، فلاسک‌های حاوی محیط کشت پس از اتوکلاو شدن در دمای اتاق قرار داده شدند تا دمای آن‌ها به ۴۳ تا ۴۵ درجه سلسیوس کاهش یابد. سپس غلظت‌های زیرکشنده‌ی ۳۵، ۴۰ و ۴۵ درصد از اسانس‌ها به فلاسک‌های حاوی محیط کشت، آب مقطر استریل و توین-۸۰ (۰/۰۲ درصد) اضافه شده و به هم زده شدند تا امولسیون یکنواختی به‌وجود آید. محیط‌های کشت حاصل درون ظروف پتری نه سانتی‌متری تقسیم شده و اجازه داده شد تا محیط جامد گردد. سپس دیسک‌های قارچ به قطر پنج میلی‌متر توسط چوب‌پنبه سوراخ‌کن[2] استریل از کشت‌های جوان قارچ تهیه شده و یک دیسک قارچ در قسمت وسط ظروف پتری حاوی محیط کشت قرار داده شد. ظروف پتری مایه‌زنی شده در اتاقک رشد در دمای ۲±۲۲ درجه سلسیوس با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند. هر آزمایش ۳ بار تکرار شد و تا زمان اشغال کامل سطح محیط کشت ظروف پتری در گروه‌های شاهد (۷ هفته)، اندازه‌گیری قطرهای رشد میسلیومی هر یک از تیمارها به‌صورت هفتگی ادامه یافت. درصد بازدارندگی غلظت‌های مختلف اسانس با استفاده از فرمول زیر تعیین شد:

$$\text{Inhibition Percentage (IP)} = C\text{-}T/C\times100$$

که در آن T میانگین قطر هاله قارچ در تیمار مورد نظر، C میانگین قطر هاله قارچ در تیمار شاهد و IP درصد بازدارندگی است.

تجزیه‌ی آماری داده‌ها

آزمایش‌ها بر پایه‌ی طرح کاملاً تصادفی انجام شدند. در صورت مشاهده‌ی مرگ و میر در گروه‌های شاهد، مرگ و میر با استفاده از فرمول آبوت (Abbot, 1925) اصلاح شد. داده‌های اصلاح شده توسط نرم‌افزار اس‌پی‌اس‌اس[3] نسخه‌ی ۱۶ تجزیه‌ی واریانس شدند. مقایسه‌ی میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد. تجزیه‌ی پروبیت داده‌ها برای تعیین غلظت‌های کشنده‌ی مورد نظر و زمان لازم برای

1- Tween 80

2- Cork borer

3- SPSS

مرگ و میر ۵۰ درصد جمعیت[1] با استفاده از نرم‌افزار اس‌پی اس‌اس انجام شد (SPSS, 2007).

نتایج

تجزیه‌ی شیمیایی اسانس‌ها

نتایج تجزیه‌ی شیمیایی اسانس‌های اکالیپتوس در جداول ۱ و ۲ نشان داده شده است. در اسانس اکالیپتوس گونه‌ی *E. microtheca* ترکیب‌های ۸،۱-سینئول[2] (۳۳/۷۷ درصد)، آلفا-پینن[3] (۱۱/۱۴ درصد)، آرومادندرن[4] (۱۸/۱۹ درصد)، بتا-پینن[5] (۸/۰۹ درصد) و ویریدیفلورول[6] (۶/۵۶ درصد) به‌عنوان اجزای اصلی شناسایی شدند (جدول ۱). هم‌چنین ۸،۱-سینئول (۴۲/۶۳ درصد)، اکتان[7] (۱۹/۹۰ درصد)، آلفا-پینن (۵/۶۶ درصد)، ویریدیفلورول (۸/۳ درصد) و دکان[8] (۳/۷۲ درصد) اجزای عمده‌ی موجود در اسانس اکالیپتوس گونه‌ی *E. spathulata* بودند (جدول ۲).

جدول ۱- نتایج حاصل از تجزیه‌ی شیمیایی اسانس *E. microtheca*

Table 1. Result of chemical analysis of essential oil of *E. microtheca*

Component	Retention time (minute)	%
α-Pinene	6	11.14
Camphene	6.508	0.47
-Pineneβ	7.322	8.09
β-Myrcene	7.648	0.36
Decane	7.915	1.93
o-Cymene	7.678	3.05
1,8-Cineole	8.972	33.77
Butanoic acid, 3-methyl, 3-methylbutyl ester	10.990	0.38
Fenchol	11.245	0.64
α-Campholenic aldehyde	11.601	0.22
trans-Pinocarveol	12.028	2.82
Pinocarvone	12.681	1.44
Terpinene-4-ol	13.114	0.77
α-Terpineol	13.530	2.17
Myrtenol	13.696	2.07
trans-p-Mentha-1(7),8-dien-2-ol	14.545	0.35
(+)-Aromadendrene	20.314	8.19
α-Amorphene	21.163	0.74
β-Selinene	21.430	0.53
Ledene	21.644	0.46
Cadina-1,3,5-triene	22.294	0.33
Epiglobulol	23.204	1.16
(1aR,4R,7R,7aS,7bR)-1a,2,3,4,6,7,7a,7b-Octahydro-1,1,4,7-tetramethyl-1H-cycloprop[e]azulene	23.382	0.92
(+) spathulenol	23.644	1.56
Viridiflorol	23.846	6.56
1-Cycloheptene, 1,4-dimethyl-3-(2-methyl-1-propene-1-yl)-4-vinyl-	24.018	1.78
Ledol	24.231	0.85
Caryophyllene-(I1)	24.492	0.46
1,6-Dimethyl-2-cyano-3-ethyl-3-piperidine	24.655	1.23
tau-Cadinol	25.056	0.62
t-Muurolol	25.365	0.61
Azunol	25.804	0.25

1- LT50
2- 1,8-Cineole
3- α-Pinene
4- Aromadendrene
5- β-Pinene
6- Viridiflorol
7- Octane
8- Decane

جدول ۲- نتایج حاصل از تجزیه‌ی شیمیایی اسانس *E. spathulata*

Table 2. Result of chemical analysis of essential oil of *E. spathulata*

Component	Retention time (minute)	%
3-Methylheptane	3.591	3.01
1-Methyl-3-ethylcyclopentane	3.900	2.13
Octane	4.090	19.90
α-Pinene	7.701	5.66
7-Hexyl-2-oxepanone	7.141	0.25
3-Methyl-nonane	7.366	0.22
Ethylcyclohexane	7.681	0.37
Decane	7.924	3.72
1,8-Cineole	8.565	42.63
iso-Amyl isovalerate	9.746	0.49
trans-Pinocarveol	10.381	0.63
Borneol L	10.791	0.47
cis-p-Mentha-1(7),8-dien-2-ol	11.135	2.95
O,N-Dimethyl-dehydrococcinine	12.500	0.24
Phenol, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-	12.761	0.30
Tetradecane	14.055	0.31
1H-Cycloprop[e]azulene, decahydro-1,1,7-trimethyl-4-methylene-, (1a.a	14.750	1.11
Aromadendrene	15.023	0.32
β-Selinene	15.349	0.68
Oxazolo[4,5-b]pyridin-2-amine	16.287	1.61
Viridiflorol	16.596	8.3
dimethyl-3,6-dihydrobenzothiophene	16.975	1.46
(+-)-5-Epi-Neointermedeol	17.355	0.68

سمیت اسانس‌ها روی شته‌ی جالیز

نتایج آزمایش‌ها نشان داد که اسانس‌های اکالیپتوس دارای سمیت تدخینی روی شته‌ی جالیز بودند. نتایج تجزیه‌ی پروبیت داده‌های حاصل از سمیت تدخینی اسانس‌ها روی حشرات شته‌ی جالیز در جدول ۳ نشان داده شده است. بر اساس جدول ۳، غلظت کشنده‌ی ۵۰ درصد برای اسانس‌های *E. spathulata* و *E. microtheca* به‌ترتیب برابر با ۱۲/۳۶۶ و ۱۵/۹۵۲ میکرولیتر بر لیتر هوا برآورد شد. با توجه به حدود اطمینان ۹۵ درصد مربوط به اسانس‌ها و هم‌پوشانی مقادیر مربوطه، از نظر آماری تفاوت معنی‌داری بین سمیت مشاهده شده در دو اسانس وجود نداشت. هر چند اسانس *E. microtheca* حدود ۱/۲۹ برابر سمیت بیشتری نسبت به *E. spathulata* نشان داد.

آزمایش‌های اثر قارچ بیمارگر روی حشرات کامل شته‌ی جالیز

قارچ بیمارگر *L. muscarium* دارای خواص حشره‌کشی معنی‌داری علیه شته‌ی جالیز بود به‌طوری‌که تلفات شته‌ی جالیز در روز سوم و در غلظت $۱۰^{۸}$ اسپور در میلی‌لیتر به ۱۰۰ درصد رسید. هم‌چنین غلظت‌های $۱۰^{۷}$ و $۱۰^{۶}$ اسپور در میلی‌لیتر به‌ترتیب در روزهای چهارم و پنجم، ۱۰۰ درصد تلفات را به‌وجود آوردند. به‌استثنای غلظت $۱۰^{۴}$ اسپور در میلی‌لیتر در روز اول، برای بقیه زمان‌ها و غلظت‌ها تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون توکی در سطح احتمال ۵ درصد بین تیمارها و گروه‌های شاهد ثبت شد. هم‌چنین مقایسه‌ی میانگین داده‌های حاصل از آزمایش‌های کشندگی قارچ بیمارگر روی شته نشان داد که با افزایش غلظت و زمان در معرض قرارگیری، میزان تلفات حشره‌ی آفت افزایش می‌یافت (جدول ۴).

با استفاده از تجزیه‌ی پروبیت داده‌های حاصل از خواص حشره‌کشی قارچ بیمارگر روی شته‌ی جالیز، میزان غلظت کشنده‌ی ۵۰ درصد جمعیت آفت در روز اول $۵/۲۰۳\times۱۰^{۹}$ اسپور در هر میلی‌لیتر محاسبه شد. میزان

غلظت کشنده‌ی ۵۰ درصد با افزایش زمان کاهش پیدا کرد و در روز دوم به $۲/۲۶۱\times۱۰^{۶}$ اسپور در میلی‌لیتر رسید که با توجه به عدم همپوشانی حدود اطمینان ۹۵ درصد مربوطه تفاوت‌ها معنی‌دار بود. در روز سوم، میزان غلظت کشنده‌ی ۵۰ درصد کاهش بیشتری نشان داده و به $۶/۹۷۰\times۱۰^{۴}$ اسپور در میلی‌لیتر رسید که از نظر آماری نسبت به مقادیر مربوطه در روز اول و دوم تفاوت معنی‌داری داشت. در روز چهارم، میزان غلظت کشنده‌ی ۵۰ درصد مجددا کاهش یافت و به $۳/۷۲۳\times۱۰^{۳}$ اسپور در میلی‌لیتر رسید، اما تفاوت معنی‌داری با مقدار متناظر آن در روز سوم به‌دلیل هم‌پوشانی حدود اطمینان ۹۵ درصد نداشت. کمترین مقدار برای غلظت کشنده‌ی ۵۰ درصد در روز پنجم به‌دست آمد ($۸/۵۸۳\times۱۰^{۲}$ اسپور در میلی‌لیتر) (جدول ۵). نتایج جدول ۵ به‌وضوح نشان می‌دهد که با افزایش زمان، میزان تلفات شته‌ی جالیز در برابر قارچ بیمارگر افزایش یافته و مقدار غلظت کشنده‌ی ۵۰ درصد کاهش یافت.

زمان لازم برای مرگ و میر ۵۰ درصد جمعیت شته‌ی جالیز در برابر قارچ بیمارگر *L. muscarium* در غلظت‌های $۱۰^{۴}$ تا $۱۰^{۸}$ در جدول ۶ نشان داده شده است. در غلظت $۱۰^{۴}$، زمان کشنده‌ی ۵۰ درصد ۷۸/۱۸۰ ساعت برآورد شد. با افزایش غلظت، مقادیر مربوط به زمان کشنده‌ی ۵۰ درصد کاهش یافته و در غلظت $۱۰^{۸}$ به ۳۱/۵۰۴ ساعت رسید (جدول ۶).

جدول ۳- نتایج تجزیه‌ی پروبیت سمیت اسانس‌های اکالیپتوس روی شته‌ی جالیز

Table 3. Results of Probit analysis of the toxicity of Eucalyptus essential oils against cotton aphid

Essential oil	LC_{50} value with 95% confidence limits (µl/l)	Relative toxicity	Slope	$\chi2$ (df=3)	Sub-lethal concentrations (µl/l)				
					LC_{25}	LC_{30}	LC_{35}	LC_{40}	LC_{45}
E. microtheca	15.952 (13.289-19.535)	1.29 (0.845-2.581)	1.521	4.949	5.745	7.211	8.901	10.869	13.188
E. spathulata	12.366 (9.667-16.383)	-	1.117	4.433	3.080	4.197	5.590	7.336	9.545

جدول ٤- داده‌های حاصل از خواص حشره‌کشی قارچ بیمارگر *L. muscarium* روی شته‌ی جالیز

Table 4. Data of insecticidal effects of pathogenic fungus *L. muscarium* against cotton aphid

Time (Day)	Concentration (spore/ml)					
	Control=0	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8
1	0.00 ± 0.000^{g}	2.50 ± 0.288^{g}	7.50 ± 0.288^{fg}	10.00 ± 0.408^{fg}	18.75 ± 0.250^{f}	28.75 ± 0.250^{ef}
2	0.00 ± 0.000^{g}	21.25 ± 0.479^{f}	30.00 ± 0.408^{e}	41.25 ± 0.479^{de}	56.25 ± 0.854^{cd}	77.50 ± 0.645^{bc}
3	0.00 ± 0.000^{g}	37.50 ± 0.289^{e}	51.25 ± 0.479^{d}	78.75 ± 0.479^{c}	83.75 ± 0.479^{b}	100.00 ± 0.000^{a}
4	0.00 ± 0.000^{g}	62.50 ± 0.645^{c}	81.25 ± 0.479^{b}	90.00 ± 0.408^{ab}	100.00 ± 0.000^{a}	100.00 ± 0.000^{a}
5	0.00 ± 0.000^{g}	82.50 ± 0.645^{b}	96.25 ± 0.479^{a}	100.00 ± 0.000^{a}	100.00 ± 0.000^{a}	100.00 ± 0.000^{a}

Mean with same letters are not significantly differences according to turkey's test at p=0.05

جدول ۵- مقادیر غلظت کشنده‌ی ۵۰ درصد و داده‌های خطوط رگرسیونی بررسی خواص حشره‌کشی قارچ بیمارگر *L. muscarium* روی شته‌ی جالیز

Table 5. LC_{50} values and regression lines data for evaluation of insecticidal effects of pathogenic fungus *L. muscarium* against cotton aphid

Time (day)	LC_{50} value with 95% confidence limits (spore/ml)	Intercept	Slope	$\chi2$ (df=3)	*P* value
1	5.203×10^{9} (5.582×10^{8} – 5.832×10^{11})	-3.190	0.328	0.463	0.927
2	2.261×10^{6} (1.207×10^{6} – 5.460×10^{6})	-2.405	0.378	1.838	0.607
3	6.970×10^{4} (4.744×10^{3} – 3.080×10^{5})	-2.593	0.535	6.735	0.081
4	3.723×10^{3} (8.314×10^{2} – 9.375×10^{3})	-2.238	0.627	3.366	0.339
5	8.583×10^{2} (17.272 – 3.501×10^{3})	-2.342	0.897	0.389	0.942

جدول ٦- مقادیر زمان لازم برای از بین رفتن ۵۰ درصد جمعیت و داده‌های خطوط رگرسیونی بررسی خواص حشره‌کشی قارچ بیمارگر *L. muscarium* روی شته‌ی جالیز

Table 6. LT_{50} values and regression lines data for evaluation of insecticidal effects of pathogenic fungus *L. muscarium* against cotton aphid

Concentration (spore/ml)	LT_{50} value with 95% confidence limits (spore/ml)	Intercept	Slope	$\chi2$ (df=3)	*P* value
10^4	78.180 (72.100 – 85.029)	-7.756	4.097	3.051	0.384
10^5	60.992 (44.367 – 78.654)	-7.719	4.324	10.595	0.014
10^6	51.027 (39.071 – 62.414)	-7.843	4.592	7.561	0.056
10^7	40.454 (28.818 – 50.976)	-7.578	4.716	8.943	0.030
10^8	31.504 (24.401 – 37.934)	-8.226	5.490	5.459	0.141

بررسی اثر هم‌زمان تیمار قارچ و اسانس‌ها روی شته

نتایج آزمایش‌های مربوط به اثر کشندگی غلظت‌های زیر کشنده‌ی اسانس *E. microtheca* شامل غلظت‌های زیر کشنده‌ی ۲۵ درصد (۵/۷۴ میکرولیتر بر لیتر)، ۳۰ درصد (۷/۲۱ میکر.ولیتر بر لیتر)، ۳۵ درصد (۸/۹۰ میکرولیتر بر لیتر)، ۴۰ درصد (۱۰/۸۷ میکرولیتر بر لیتر) و ۴۵ درصد (۱۳/۱۹ میکرولیتر بر لیتر) و غلظت 10^4 اسپور در میلی‌لیتر قارچ بیمارگر به‌صورت جدا و توام روی شته‌ی جالیز در جدول ۷ نشان داده شده است. میانگین درصد تلفات اثر هم‌زمان قارچ با غلظت‌های زیرکشنده‌ی ۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۴۰ درصد از مجموع تلفات این غلظت‌ها و غلظت 10^4 اسپور قارچ بیمارگر بالاتر بود که نشان‌دهنده‌ی بالاتر رفتن خواص حشره‌کشی در کاربرد توام آنها می‌باشد. با این حال اثر کشندگی غلظت ۱۳/۱۹ میکرولیتر بر لیتر اسانس در کاربرد توأم با قارچ بیمارگر از مجموع تلفات آن‌ها پایین‌تر بود، به‌عبارتی با افزایش غلظت‌های مورد استفاده از اسانس اکالیپتوس گونه‌ی *E. microtheca* از خواص شته‌کشی آن‌ها کاسته شده است (جدول ۷).

نتایج آزمایش‌های مربوط به اثر کشندگی غلظت‌های زیرکشنده‌ی اسانس *E. spathulata* شامل غلظت‌های کشنده‌ی ۲۵ درصد (۳/۰۸ میکرولیتر بر لیتر)، ۳۰ درصد (۴/۲۰ میکرولیتر بر لیتر)، ۳۵ درصد (۵/۵۹ میکرولیتر بر لیتر)، ۴۰ درصد (۷/۳۷ میکرولیتر بر لیتر) و ۴۵ درصد (۹/۵۵ میکرولیتر بر لیتر) و غلظت 10^4 اسپور در میلی‌لیتر قارچ *L. muscarium* به‌صورت جدا و توام روی شته‌ی جالیز در جدول ۷ نشان داده شده است. با توجه به جدول ۷، میانگین درصد تلفات اثر هم‌زمان قارچ با غلظت‌های زیر کشنده‌ی ۲۵، ۳۰ و ۳۵ درصد از مجموع تلفات این غلظت‌ها و غلظت 10^4 اسپور قارچ بیمارگر بالاتر بود که نشان‌دهنده‌ی بالاتر رفتن خواص حشره‌کشی در کاربرد توام آن‌ها می‌باشد. هم‌چنین اثر کشندگی غلظت‌های ۷/۳۴ و ۹/۵۵ میکرولیتر بر لیتر اسانس در کاربرد توام با قارچ بیمارگر از مجموع تلفات آن‌ها پایین‌تر بود. می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که با افزایش غلظت‌های مورد استفاده از اسانس اکالیپتوس گونه‌ی *E. spathulata* هم از خواص شته‌کشی آن‌ها کاسته شده است (جدول ۷).

بررسی اثر اسانس‌ها روی قارچ

نتایج آزمایش‌های مربوط به اثر غلظت‌های زیرکشنده‌ی اسانس اکالیپتوس گونه‌ی *E. microtheca* در رشد میسلیومی قارچ بیمارگر *L. muscarium* تا هفت هفته بعد از تیمار در جدول ۸ نشان داده شده است. بر اساس داده‌های موجود در جدول مذکور، غلظت ۸/۹۰ میکرولیتر بر لیتر در هفته اول کمترین و غلظت ۱۳/۱۹ میکرولیتر بر لیتر در هفته‌ی هفتم بیشترین درصد بازدارندگی را نشان دادند. با این وجود، درصد بازدارندگی اسانس در غلظت‌های مورد مطالعه پایین بود.

غلظت‌های زیرکشنده‌ی اسانس اکالیپتوس گونه‌ی *E. spathulata* در رشد میسلیومی قارچ بیمارگر اثر بازدارندگی قابل توجهی نشان دادند. اثر بازدارندگی اسانس با افزایش زمان و غلظت آن بالاتر رفت و در هفته‌ی هفتم و غلظت ۹/۵۵ میکرولیتر بر لیتر به حداکثر مقدار خود (۱۷/۳۷۴ درصد) رسید (جدول ۹).

جدول ۷- سمیت غلظت‌های زیرکشنده‌ی اسانس‌های *E. microtheca* و *E. spathulata* همراه با غلظت 10^4 اسپور در میلی‌لیتر از قارچ بیمارگر *L. muscarium* و روی شته‌ی جالیز بعد از ۲۴ ساعت

Table 7. Toxicity of sub-lethal concentrations of *E. microtheca* and *E. spathulata* essential oils in combination with concentration 10^4 (spore/ml) of *L. muscarium* against cotton aphid after 24 h

Essential oil	Essential oil concentration (µl/l)	Observed mortality*	Expected mortality**	SR***
E. microtheca	5.74	32.50±0.289	26.25	0.81
	7.21	36.25±0.75	31.25	0.86
	8.90	38.75±0.629	33.75	0.87
	10.87	42.5±0.289	41.25	0.97
	13.19	43.75±0.250	45.00	1.03
E. spathulata	3.08	26.25±0.250	22.50	0.86
	4.20	32.25±0.250	27.50	0.86
	5.59	33.75±0.479	32.50	0.96
	7.34	38.75±0.250	40.00	1.03
	9.55	40.00±0.408	43.75	1.09

*Mean mortality percentage of essential oil concentrations in combination with concentration 10^4 (spore/ml) of *L. muscarium*.
**Sum of mean mortality percentage of essential oil concentrations and *L. muscarium*
***SR is Synergistic Ratio=Expected mortality/Observed mortality. Since SR values were between 0.7-1.8, observed phenomena are additive for all essential oils' concentrations.

جدول ۸- درصد بازدارندگی برخی از غلظت‌های زیرکشنده‌ی اسانس اکالیپتوس *E. microtheca* در رشد میسلیومی قارچ بیمارگر *L. muscarium*

Table 8. Inhibition percentage of some sub-lethal concentrations of *E. microtheca* essential oil on mycelial growth of pathogenic fungus *L. muscarium*

Concentration	Time (week)						
(µl/l)	1	2	3	4	5	6	7
8.90	3.509±0.033^{h}	4.301±0.067^{g}	4.964±0.033^{fg}	5.294±0.033^{f}	6.091±0.033^{e}	6.140±0.033^{e}	6.564±0.033^{e}
10.87	5.263±0.058^{f}	6.452±0.058^{e}	7.801±0.067^{d}	8.235±0.058^{c}	8.629±0.058^{c}	9.210±0.058^{b}	9.266±0.033^{b}
13.19	7.018±0.033^{de}	7.527±0.033^{d}	8.235±0.058^{c}	8.511±0.058^{c}	9.137±0.033^{bc}	9.649±0.033^{b}	11.197±0.033^{a}

Same letters do not show significantly differences according to turkey's test at p=0.05.

جدول ۹- درصد بازدارندگی برخی از غلظت‌های زیرکشنده‌ی اسانس اکالیپتوس گونه‌ی *E. spathulata* در رشد میسلیومی قارچ بیمارگر *L. muscarium*

Table 9. Inhibition percentage of some sub-lethal concentrations of *E. spathulata* essential oil on mycelial growth of pathogenic fungus *L. muscarium*

Concentration	Time (week)						
(µl/l)	1	2	3	4	5	6	7
5.59	5.263±0.058^{k}	6.452±0.058^{j}	7.092±0.033^{i}	7.647±0.033^{i}	8.122±0.033^{h}	8.772±0.088^{h}	9.266±0.088^{g}
7.34	10.526±0.058^{f}	11.828±0.088^{ef}	12.057±0.067^{e}	12.353±0.033^{e}	13.706±0.240^{de}	14.474±0.058^{d}	14.672±0.067^{cd}
9.55	14.035±0.033^{d}	14.035±0.033^{c}	15.603±0.067^{c}	15.882±0.088^{c}	16.244±0.153^{b}	17.105±0.058^{a}	17.374±0.033^{a}

Same letters do not show significantly differences according to turkey's test at p=0.05.

بحث

اجزای شیمیایی اسانس‌های گونه‌های مختلفی از گیاهان جنس اکالیپتوس در سال‌های اخیر مورد مطالعه قرار گرفته‌اند و در اغلب موارد، ترکیب ۱،۸-سینئول به‌عنوان ترکیب اصلی در اسانس‌های اکالیپتوس شناخته شده است (Alzogaray et al., 2011؛ Jaimand et al., 2009؛ Sefidkon et al., 2007). گونه‌های اکالیپتوس بررسی شده در تحقیق حاضر هم دارای ترکیب ۱،۸-سینئول بودند. در پژوهش انجام شده توسط Sefidkon et al. (2007)، ۱،۸-سینئول (۳۴/۰ درصد)، پنتا-سایمن (۱۲/۴ درصد)، آلفا پینن (۱۰/۷ درصد) و بتا-پینن (۱۰/۵ درصد) در اسانس *E. microtheca* و ۱،۸-سینئول (۷۲/۵ درصد) و آلفا- پینن (۱۲/۷ درصد) در اسانس *E. spathulata* به‌عنوان ترکیبات عمده شناسایی شدند. در تحقیق حاضر، مقدار ترکیب ۱،۸-سینئول در اسانس‌های مذکور به‌ترتیب ۳۳/۷۷ و ۴۲/۶۳ درصد برآورد شد. هم‌چنین مقدار ترکیب آلفا-پینن هم ۱۱/۱۴ و ۵/۶۶ درصد بود که با مقادیر برآورد شده در تحقیق Sefidkon et al. (2007) مغایرت دارد. تفاوت‌های مشاهده شده بین نوع ترکیب اصلی و یا مقدار آن در بررسی مذکور و تحقیق حاضر ممکن است از تفاوت‌های ژنتیکی احتمالی در گیاهان، شرایط محیط رشد این گیاهان، زمان برداشت، تنش آبی، نحوه استخراج و روش آنالیز شیمیایی اسانس‌ها ناشی شده باشد (Ben Jemaa et al., 2012؛ Riahi et al., 2015؛ Rocha et al., 2014).

تاکنون مطالعات متعددی در خصوص امکان استفاده از اسانس‌های مستخرج از گونه‌های مختلف اکالیپتوس به‌عنوان آفت‌کش انجام شده است (Alzogaray et al., 2011؛ Batish et al., 2008؛ Ben Jemaa et al., 2012) که نتایج تحقیق حاضر با نتایج این تحقیق‌ها مطابقت دارد. با این حال، خواص حشره‌کشی گونه‌های *E. microtheca* و *E. spathulata* برای اولین بار در تحقیق حاضر برآورد شده است. هم‌چنین خواص شته‌کشی برخی از اسانس‌های گیاهی و امکان استفاده از این ترکیبات در مدیریت تعدادی از شته‌های آفت هم در پژوهش‌های اخیر بررسی شده است. برای مثال، سمیت اسانس‌های علف گربه (*Nepeta cataria* L.)، مرزنجوش (*Origanum majorana* L.) (Pavela, 2006) و اکالیپتوس (*E. camaldulensis* Dehnh.) (Hosseini Amin et al., 2012) روی شته‌ی مومی کلم (*Brevicoryne brassicae* L.) و اسانس‌های برگ‌بو (*Laurelia sempervirens* (Ruiz and Pavon)) و دریمیس (*Drimys winteri* JR Forster and G (Forster) روی شته‌ی نخود (*Acyrthosiphon pisum* (Harris)) (Zapata et al., 2010) گزارش شده است. تحقیقات اخیر نشان داده‌اند که سمیت اسانس‌های گیاهی روی حشرات آفت با اجزای شیمیایی آن‌ها ارتباط مستقیمی دارند (Regnault-Roger et al., 2012). به‌عبارتی، سمیت اسانس‌ها را به ترکیبات اصلی موجود در آن نسبت می‌دهند و گفته می‌شود که وجود این ترکیبات و اثرات توام آن‌ها باعث بروز اثرات زیستی اسانس‌ها می‌شود (Isman and Grieneisen, 2014).

اثر بیمارگری قارچ *L. muscarium* روی برخی شته‌ها و شپشک‌ها نیز به‌خوبی نشان داده شده است (Askary et al., 1998؛ Wraight et al. 2001). نتایج تحقیق حاضر به‌وضوح قدرت بیماری‌زایی این قارچ روی شته‌ی جالیز را نشان می‌دهد. در تحقیقی مشابه، Feng et al. (1990) مقدار غلظت کشنده‌ی ۵۰ درصد قارچ *Verticillium lecanii* (جدایه‌ی DNVL870) روی شش گونه از شته‌های آفت را بررسی کرده و نشان دادند که قارچ مذکور دارای قدرت بیمارگری مناسبی روی این شته‌ها بود. در تحقیق مذکور مرگ و میر از روز سوم شروع شده است. در تحقیقی دیگر، Ashouri et al. (2003) از قارچ *V. lecanii* (جدایه‌ی DAOM198499) برای کنترل شته‌ی سبز هلو استفاده کردند. با وجود این‌که در تحقیق مذکور از غلظت‌هایی مشابه با غلظت‌های مورد استفاده در تحقیق حاضر استفاده شد، اما مرگ و میر شته از روز سوم شروع شد. در حالی‌که در تحقیق حاضر، مرگ و میر از روز

اول شروع شد. چنین تفاوت‌هایی ممکن است ناشی از شرایط دمایی و رطوبتی متفاوت، نوع گونه یا جدایه‌ی قارچ و گونه‌ی شته‌ی مورد مطالعه باشد.

در مورد کاربرد هم‌زمان قارچ‌های بیمارگر حشرات با حشره‌کش‌ها و ترکیبات مستخرج از گیاهان برای کنترل آفات مطالعات کمی صورت گرفته است. برای مثال، Akbar et al. (2005) نشان دادند که حشره‌کش گیاهی آزادیراکتین با نام تجاری مارگوساید[1] سبب به تأخیر انداختن دوره‌ی شفیرگی شپشه‌ی قرمز آرد و عدم کاهش جوانه‌زنی قارچ حشره‌کش *Beuveria bassiana* شد. هم‌چنین Mohan et al. (2007)، ۳۰ جدایه از قارچ *B. bassiana* را با فرم تجاری عصاره نیم ترکیب کردند. در تمام جدایه‌ها رشد کنیدیوم به تاخیر افتاد، اما مذکور کاهش معنی‌دار نبود. تعداد ۲۳ جدایه‌ی قارچ از نظر ترکیب با نیم سازگار بودند. در جدایه‌های قارچی حساس به نیم، رشد کاهش یافت، اما کاملا بازدارنده نبود. ترکیب تیمارها زمانی که جدایه‌های قارچی سازگار با نیم استفاده می‌شد، دارای اثر سینرژیستی روی مرگ و میر حشرات بود. اگرچه در جدایه‌های حساس قارچ به نیم اثر آنتاگونیستی نیز مشاهده شد. در تحقیق حاضر برای اولین بار امکان کاربرد توام اسانس‌های گیاهی و قارچ بیمارگر *L. muscarium* بررسی شد. استفاده از غلظت‌های زیرکشنده‌ی اسانس‌های اکالیپتوس (گونه‌های *E. micotheca* و *E. spathulata*) اثرات متفاوتی در قدرت بیمارگری قارچ داشتند. هر دو گونه در غلظت‌های زیرکشنده‌ی ۲۵، ۳۰ و ۳۵ درصد دارای اثر سینرژیستی با قارچ بیمارگر بودند و این اثر با افزایش غلظت کم شده و در بالاترین غلظت (غلظت کشنده‌ی ۴۵ درصد) به اثر آنتاگونیستی تبدیل شد.

استفاده از ترکیبات شیمیایی، اثرات جانبی متعددی از قبیل آلودگی محیط زیست، اثرات مخرب در اکوسیستم و سلامتی انسان و از بین رفتن دشمنان طبیعی آفت را در پی دارد. از این‌رو استفاده از جایگزین‌های سالم و کم‌خطر ضروری می‌باشد. تحقیق حاضر استفاده از اسانس‌های اکالیپتوس گونه‌های *E. microtheca* و *E. spathulata* را برای کنترل شته‌ی جالیز پیشنهاد می‌کند. هم‌چنین بر اساس نتایج تحقیق حاضر، قارچ *L. musarium* توانایی کنترل شته‌ی جالیز را دارد و می‌توان از این عامل بیولوژیک در مدیریت تلفیقی آفت مذکور استفاده کرد. با توجه به مشاهده‌ی اثرات جمع‌پذیری در استفاده از غلظت‌های زیرکشنده‌ی اسانس‌های مورد مطالعه همراه با قارچ *L. muscarium*، می‌توان با استفاده توأم از آن‌ها اثرات کشندگی را تقویت کرد. البته باید توجه داشت که انجام پژوهش‌های تکمیلی برای بررسی امکان وجود خاصیت گیاهسوزی اسانس‌های مذکور و اثرات منفی آن‌ها در رشد قارچ‌های بیمارگر ضروری به نظر می‌رسد.

سپاس‌گزاری

بدین وسیله نویسنده گان مقاله از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه محقق اردبیلی به دلیل حمایت مالی تحقیق حاضر کمال تقدیر و سپاس گزاری را دارند.

REFERENCES

Abbasi, B. 1995. Evaluation of *Verticillium lecanii* in the control of *Myzus persicae*. M. Sc. Thesis, Urmia University, Urmia, Iran. (in Frasi).

Abbott, W.S. 1925. A method for computing the effectiveness of an insecticide. Journal of Economic Entomology, 18: 265-267.

1- Margoside

Adams, R.P. 2001. Identification of essential oil components by gas chromatography and mass spectroscopy, 3nd edn. Allured Publishing Corporation: Carol Stream, 750 P.

Akbar, W., Lord, J. C., Nechols, J. R., and Loughin, T. M. 2005. Efficacy of *Beauveria bassiana* for red flour beetle when applied with plant essential oils or in mineral oil and organosilicone carriers. Journal of Economic Entomology, 98(3): 683-688.

Alizadeh, A., Alizadeh, O., Amari, G., and Zare, M. 2013. Essential oil composition, total phenolic content, antioxidant activity and antifungal properties of Iranian *Thymus daenensis* subsp. *daenensis* Celak as in influenced by ontogenetical variation. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 16(1): 59-70.

Alzogaray, R., Lucia, A., Zerba, E.N., and Masuh, H. 2011. Insecticidal activity of essential oils from eleven *Eucalyptus* spp. and two hybrids: lethal and sublethal effects of their major components on *Blattella germanica*. Journal of Economic Entomology, 104: 595-600.

Amizadeh, M., Hejazi, M.J., and Askari Saryazdi, G. 2013. Fumigant toxicity of some essential oils on *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). International Journal of Acarology, 39: 285-289.

Ashouri, A., Arzanian, N., and Askary, H. 2003. Interaction of *Verticillium lecanii* (Zimm.) viegas and *Adonia variegate* (Col: Cocconellidae) pathogen and predator of aphids. Colloque international tomate sous abri, protection integree agriculture biologique. Avignon, France. P. 158-162.

Askary, H., Carrier, Y., Belanger, R.R., and Brodeur, J. 1998. Pathogenicity of the fungus *Verticillium lecanii* to aphids and powdery mildew. Biocontrol Science and Technology, 8: 23-32.

Batish, D.R., Singh, H.P., Kohli, R.K., and Kaur, S. 2008. Eucalyptus essential as natural pesticide. Forest Ecology and Management, 256: 2166-2174.

Ben Jemâa, J.M., Haouel, S., Bouaziz, M., and Khouja, M.L. 2012. Seasonal variations in chemical composition and fumigant activity of five *Eucalyptus* essential oils against three moth pests of stored dates in Tunisia. Journal of Stored Product Research, 48: 61-67.

Blackman, R.L., and Eastop, V.F. 2000. Aphids on the world's crops: An identification and information guide. 2nd edn. John Wiley and Sons: Chichester, 476 P.

Devi, N., and Maji, T.K. 2011. Neem seed oil: Encapsulation and controlled release-search for a greener alternative for pest control. In Stoytcheva, M. (Ed.). Pesticides in the modern world-pesticides use and management. In Tech, 520 P.

Ebadollahi, A. 2013. Essential oils isolated from Myrtaceae family as natural insecticides. Annual Review & Research in Biology, 3(3): 148-175.

Ebadollahi, A., and Jalali-Sendi, J. 2015. A review on recent research results on bio-effects of plant essential oils against major Coleopteran insect pests. Toxin Reviews, 34(2): 76-91.

Edwards, O., Franzmann, B., Thackray, D., and Micic, S. 2008. Insecticide resistance and implications for future aphid management in Australian grains and pastures: A review. Australian Journal of Experimental Agriculture, 48: 1523-1530.

Elaissi, A., Rouis, Z., Ben Salem, N.A., Mabrouk, S., Ben Salem, Y., Bel Haj Salah, K., Aouni, M., Farhat, F., Chemli, R., Harzallah-Skhiri, F., and Khouja, M.L. 2012. Chemical composition of 8 eucalyptus species' essential oils and the evaluation of their antibacterial, antifungal and antiviral activities. BMC Complementary and Alternative Medicine, 12: 81.

Feng, M.G., Johnson, J.B., and Kish, L.P. 1990. Virulence of *Verticillium Lecanii* and an aphid-derived isolate of *Beauveria bassiana* (Fungi: Hyphomycetes) for six species of cereal infesting aphids (Hom: Aphididae). Environmental Entomology, 19: 815-820.

Gupta, A., Sharma, S., and Naik, S.N. 2011. Biopesticidal value of selected essential oils against pathogenic fungus, termites, and nematodes. International Biodeterioration & Biodegradation, 65: 703-707.

Hosseini Amin, S.B., Shahrokhi, Sh., Aliniya, F., and Khosroshahli, M. 2012. Evaluation of lethal and repellent activity of the essential oils of *Laurus nobilib* and *Eucalyptus camaldulensis* against *Brevicoyne brassicae.* Biocontrol in Plant Protection, 1(1): 1-11. (In Farsi with English abstract).

Isman, M.B., and Grieneisen, M.L. 2014. Botanical insecticide research: many publications, limited useful data. Trends in Plant Sciences, 19: 140-145.

Isman, M.B., Miresmailli, S., and Machial, C. 2011. Commercial opportunities for pesticides based on plant essential oils in agriculture, industry and consumer products. Phytochemistry Reviews, 10: 197-204.

Jaimand, K., Rezaee, M.B., and Nadery-Hajeebagher-Kandy, M. 2009. Volatile oil constituents of the *Eucalyptus viridis* R. T. Baker and *Eucalyptus oleosa* F. Muell. leaves from Iran. Journal of Medicinal Plants, 8: 105-108.

Khalfi, O., Sahraoui, N., Bentahar, F., and Boutekedjiret, C. 2008. Chemical composition and insecticidal properties of *Origanum glandulosum* (Desf.) essential oil from Algeria. Journal of Sciences in Food and Agriculture, 88: 1562-1566.

Lang, G., and Buchbauer, G. 2012. A review on recent research results (2008–2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. Flavour and Fragranc Journal, 27: 13-39.

Lucia, A., Licastro, S., Zerba, E., and Masuh, H. 2008. Yield, chemical composition and bioactivity of essential oils from towelve species of *Eucalyptus* on *Aedes aegypti* (L.) larvae (Diptera: Culicidae). Entomologia Experimentalis et Applicata, 129(1): 107-114.

Mohan, M.C., Reddy, N.P., Deri, U.K., Kangara, R., and Sharma, H.C. 2007. Growth and insect assays of *Beauveria bassiana* with neem to test their compatibility and synergism. Biocontrol Science and Technology, 17(10): 1059-1069.

Pavela, R. 2006. Insecticidal activity of essential oils against cabbage aphid *Brevicoryne brassicae*. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 9(2): 99-106.

Regnault-Roger, C., Vincent, C., and Arnasson, J.T. 2012. Essential oils in insect control: Low-risk products in a high-stakes world. Annual Review of Entomology, 57: 405-425.

Riahi, L., Ghazghazi, H., Ayari, B., Aouadhi, C., Klay, I., Chograni, H., Cherif, A., and Zoghlami, N. 2015. Effect of environmental conditions on chemical polymorphism and

biological activities among *Artemisia absinthium* L. essential oil provenances grown in Tunisia. Industrial Crop and Products, 66: 96-102.

Robertson, J.L., Preisler H.K., and Russell, R.M. 2007. PoloPlus: Probit and logit analysis user's guide, le or a software. Petaluna, CA.

Rocha, R.P., Melo, E.D.C., Barbosa, L.C.A., Dos Santos, R.H.S., Cecon, P.R., Dallacort, R., and Santi, A. 2014. Influence of plant age on the content and composition of essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. Journal of Medicinal Plant Research, 8: 1121-1126.

Salama, M.M., Taher, E.E., and El Bahy, M.M. 2012. Molluscicidal and mosquitocidal activities of the essential oils of *Thymus capitatus* L. and *Marrubium vulgare* L. American Journal of Drug Discovery and Development, 2: 204-211.

Samie, M.A., Alizadeh, A., and Eizadi, H. 2011. Effect of some plant extracts and pesticides on entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* under laboratory conditions. Iranian Journal of Plant Protection Science, 41(2): 327-336. (In Frasi with English Abstract).

Sampson, B.J., Tabanca, N., Kirimer, N., Demirci, B., Husnu Can Baser, K., Khan, I.A., Spiers, J.M., and Wedge, D.E. 2005. Insecticidal activity of 23 essential oils and their major compounds against adult *Lipaphis pseudobrassicae* (Davis) (Homoptera: Aphididae). Pest Management Science, 61: 1122-1128.

Sefidkon, F., Assareh, M.H., Abravesh, Z., and Barazandeh, M.M. 2007. Chemical composition of the essential oils of four cultivated *Eucalyptus* species in Iran as medicinal plants (*E. microtheca*, *E. spathulata*, *E. largiflorens* and *E. torquata*). Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 6(2): 135-140.

Sefidkon, F., Kalvandi, R., Atri, M., and Barazandeh, M.M. 2005. Essential oil variability of *Thymus eriocalyx* (Ronniger) Jalas. Flavour and Fragrance Journal, 20: 521-524.

SPSS, 2007. SPSS for windows, Version 16.0. SPSS Inc, Chicago.

Weiguo, F., Leng, B., Xiao, Y., Jin, K., Ma, J., Fan, Y., Feng, J., Yang, X., Zhang, Y., and Pei, Y. 2005. Cloning of *Beauveria bassiana* chitinase gene *Bbchit1* and its application to improve fungal strain virulence. Applied and Environmental Microbiology, 71: 363-370.

Wraight, S.P., Jackson, M.A., and De Kock, S.L. 2001. Production, stabilization and formulation of fungal biocontrol agents. In Butt, T.M., Jackson C. and Magan, N. (eds), Fungi as bio control agents. CABI, pp: 233-287.

Zamani, A.A., Talebi, A.A., Fathipour, Y., and Baniameri, V. 2006. Effect of temperature on biology and population growth parameters of *Aphis gossypii* Glover (Hom. Aphididae) on greenhouse cucumber. Journal of Applied Entomology, 130(8): 453-460.

Zapata, N., Lognayc, G., and Smagghe, G. 2010. Bioactivity of essential oils from leaves and bark of *Laurelia sempervirens* and *Drimys winteri* against *Acyrthosiphon pisum*. Pest Management Science, 66: 1324-1331.

Insecticidal effects of essential oils from *Eucalyptus microtheca* Muell. and *E. spathulata* Hook. along with pathogenic fungus *Lecanicillium muscarium* against cotton aphid

J. Razmjou[1]*, M. Davari[2] and A. Ebadollahi[3]

1. ***Corresponding Author:** Associate Professor, Department of Plant Protection, College of Agricultural Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran (Razmjou@uma.ac.ir)
2. Assistant Professor, Department of Plant Protection, College of Agricultural Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
3. Assistant Professor, Moghan College of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

Received: 9 January 2015 Accepted: 11 August 2016

Abstract

The search for environmentally friendly insecticidal substances is necessary because of negative effects of conventional chemical insecticides. In the present study, the insecticidal activity of essential oils (EOs) from two *Eucalyptus* species including *Eucalyptus microtheca* Muell. and *E. spathulata* Hook. and the entomopathogenic fungus *Lecanicillium muscarium* (Zare & Gams) was assessed against cotton aphid (*Aphis gossypii* Glover). The essential oils were extracted by Clevenger apparatus and their chemical analysis was made by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Based on the results, 1,8-cineole (33.77%) and α-pinene (11.14%) in the *E. microtheca* and 1,8-cineole (42.63%) and ectan (19.90%) in the *E. spathulata* EOs were found as main components. *A. gossypii* was very susceptible to the tested essential oils and the LC_{50} values were 12.366 and 15.952 µl/l against adults of cotton aphid for *E. spathulata* and *E. microtheca* EOs, respectively. The 1 day-LC_{50} value with *L. muscarium* was 5.203×10^9 spore/ml. By increasing the time, the LC_{50} value decreased and reached 8.583×10^2 spore/ml after 5 days. An additive effect with sub-lethal concentrations of EOs and *L. muscarium* was attained. According to the results of the present study, the essential oils of *E. microtheca* and *E. spathulata* and *L. muscarium* fungus have a potential in the management of cotton aphid.

Keywords: Plant essential oils, Lecanicillium muscarium, Eucalyptus, Synergistic effect, GC-MS